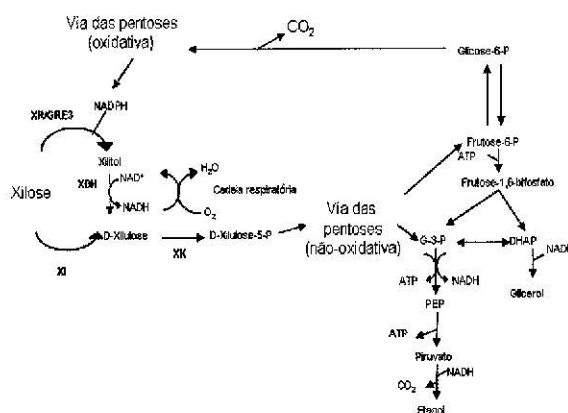


* R R P T 1 1 D 1 4 2 7 A 2 *

(51) Int.Cl.:
C12N 1/19
C12N 9/92
C12P 7/06
C12P 7/08
C12R 1/865

(57) Resumo: SACCHAROMYCES CEREVISIAE GENETICAMENTE MODIFICADA E SEU USO A inovação ora proposta diz respeito à levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada por meio da inserção via plasmidial (pYEP-PGK) do gene *xylA* da bactéria *Burkholderia cenocepacia*, que proporciona à levedura modificada a expressão da enzima xilose isomerase. A presente invenção inclui ainda o uso das ditas leveduras geneticamente modificadas na fermentação de glicose e xilose de hidrolisados de biomassa, como o bagaço da cana-de-açúcar, para a produção de etanol.



SACCHAROMYCES CEREVISIAE GENETICAMENTE MODIFICADA E SEU USO

CAMPO TÉCNICO

5 A inovação ora proposta se refere à levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, contendo o gene *xylA* da bactéria *Burkholderia cenocepacia* inserido via vetor plasmidial (pYEP PGK), permitindo a essa levedura expressar a enzima xilose isomerase para a produção de etanol pela fermentação da glicose e xilose de hidrolisados de biomassa.

ESTADO DA ARTE

Devido à grande dependência econômica por combustíveis fósseis, várias pesquisas têm sido realizadas em busca de um novo combustível cuja fonte seja renovável. Atualmente muita atenção tem sido dada ao etanol, álcool de dois carbonos cuja obtenção por rota biológica é feita por fermentação de mostos ricos em mono e dissacarídeos, catalisada por levedura de uso difundido a nível industrial, a *Saccharomyces cerevisiae*. Etanol pode também ser produzido a partir da biomassa celulósica fermentada, adicionando assim valor de mercado a uma matéria considerada resíduo da agroindústria e agregando, acima de tudo, o conceito de sustentabilidade (Van Maris *et al.*, 2006).

Fatores como aumento no preço do petróleo, diminuição dos recursos de combustíveis fósseis e aumento da poluição do ar fazem com que exista uma expectativa de aumento no consumo de etanol. Segundo números apresentados durante a VI Conferência Internacional da Datagro, o Brasil consumiu 16,1 bilhões de litros de etanol em 2005 e tem uma demanda de 27 bilhões para 2010 (<http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/news-oportunidade.php> - acessado em 20/07/2007). Assim, para atender a crescente demanda por etanol é fundamental encontrar formas de otimizar a sua produção.

O uso do bagaço da cana-de-açúcar é uma das melhores alternativas para a produção do bioetanol no Brasil já que esse material lignocelulósico é um dos mais abundantes nos países tropicais (Santos, J.R.A. *et al.*, 2007). De acordo com dados disponibilizados pelo Ministério da

Agricultura Pecuária e Abastecimento em seu anuário foram produzidos no Brasil na safra 2008/2009 cerca de 560 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, a partir dos quais se obteve aproximadamente 27,6 bilhões de litros de etanol(http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/arquivos_portal/anuario_cana.pdf - acessado em 07/11/2010). Segundo estimativas, nessa safra foram produzidas cerca de 150 milhões de toneladas de bagaço de cana, fração esta oriunda do processo de moagem da cana (Ely, R. N. 2009). Essa matriz lignocelulósica é composta majoritariamente por três macromoléculas: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é formada por moléculas de glicose unidas por ligações do tipo β -1,4, sendo que a hidrólise desta nos permite a liberação da glicose. Esta é uma hexose que responde por cerca de 38% da massa seca do bagaço e, liberada, pode ser prontamente fermentada pela levedura *S. cerevisiae*, representando um ganho na produção de etanol. Já a hemicelulose é composta por hexoses e pentoses, porém com um predomínio de uma pentose que responde por cerca de 24% do peso seco do bagaço: a xilose (Lee, J.*et al.*, 1997). Esse açúcar pode ser liberado por hidrólise da biomassa supracitada, porém é consumido a baixos níveis e não é fermentado pela levedura *S. cerevisiae*. Sem o aproveitamento dessa fração para fermentação não se pode maximizar a produção de etanol, o que pode vir a inviabilizar a nível econômico a produção de álcool a partir da biomassa lignocelulósica.

Além disso, vale ser ressaltado que normalmente, depois que a cana-de-açúcar é colhida, os agricultores diminuem os resíduos pela queima ao ar livre (Dawson, L.*et al.*, 2006). A fumaça dessa queima contém partículas com tamanhos menores que 10 μ m que podem ser inaladas (Givens, J.D.*et al.*, 1996). A prática de queima ao ar livre além de afetar a qualidade do ar também afeta a qualidade de vida das pessoas que vivem próximo à área (Dawson, L.*et al.*, 2006). Por outro lado, a queima do bagaço oriundo da moagem da cana é muito usada para geração de vapor e energia elétrica. Portanto, a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos diminui os problemas gerados para o meio ambiente a partir dos resíduos agrícolas à medida que esses resíduos deixam de ser queimados, além de, evidentemente, ter como produto um combustível que não é de origem fóssil.

No hidrolisado de biomassa vegetal, a pentose xilose é o principal monossacarídeo que não pode ser fermentado por cepas do tipo selvagem de

S. cerevisiae. Apesar de *S. cerevisiae* não poder fermentar xilose, esta não é uma característica geral das leveduras. As primeiras observações a respeito da fermentação de xilose por leveduras datam do início de 1980. Leveduras *Tannophilus* como *Pachysolentropicalis* (Slininger *et al.*, 1982) e *Candida* (Gong CS, 1981b) são capazes de fermentar xilose a etanol. Em uma análise exaustiva das 200 cepas de levedura capazes de crescer em xilose, dezenove produziram 0,1-1,0 g/l de etanol sob condições de fermentação de 20 g/l xilose. As espécies *Brettanomyces naardenensis*, *Candida shehatae*, *Candida tenuis*, *Pichia tannophilus*, *Pichia segobiensis* e *Pichia stipitis* produziram mais de 1,0 g/L (Toivola *et al.*, 1984; van Maris *et al.*, 2006). Uma vez que xilose é um componente significativo de biomassas, não é de se estranhar que todas estas leveduras sejam provenientes de instalações relacionadas com as fontes. Surpreendentemente, apenas um pequeno número de leveduras que pode metabolizar xilose é capaz de fermentar este açúcar a etanol. Esta aparente discrepância é intrínseca à via metabólica de xilose (Fig. 1), descrita pela primeira vez por Gunsalus *et al.* (1955).

A fermentação de xilose em leveduras envolve duas oxidorreduções, xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH). Estas oxidorreduções requerem como cofator NADPH e NAD⁺, respectivamente, que precisam ser regenerados para manter o equilíbrio redox. NADPH pode ser produzido na via oxidativa das pentoses, mediante o desvio da frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, produzidos na parte não oxidativa desta via. Sob condições aeróbicas, NADH pode ser reoxidado através da cadeia respiratória. Contudo, em anaerobiose outra molécula aceptora de elétrons é necessária para reoxidação do NADH, como acetoína (Bruinenberget *et al.*, 1984) ou furfural (Wahlbom & Hahn-Hagerdal, 2002). Se não houver aceptor de elétrons, a célula não pode manter o equilíbrio redox nem fermentar xilose. A segunda solução para esse desequilíbrio redox seria converter NADH em NADPH por uma oxidorredução. No entanto, esta enzima ainda não foi descoberta em leveduras (Blank *et al.*, 2005) e a introdução de uma oxidorredução heteróloga em *S. cerevisiae*, favoreceu a produção de NADPH (Nissen *et al.*, 2001). As leveduras como a *Pichia stipitis* e *Tannophilus pachysolen* são capazes de fermentar xilose sob condições anaeróbicas, poisas propriedades da enzima xilose redutase (XR) destes microrganismos, são capazes de utilizar tanto

NADH quanto NADPH (Matsushika *et al.*, 2009). A desvantagem inerente a esta dupla especificidade de XR é a produção de xilitol. Para cada NADH que é reoxidado por uma XR é produzido como subproduto xilitol. O rendimento teórico de etanol, xilitol e glicerol é dado em função da proporção de fluxos das

5 NADPH e NADH-redutases ligadas à xilose. Assumindo condições anaeróbicas e não formando glicerol ou ocorrendo a taxas inferiores a um: 1) Quando o razão NADPH / NADH é igual a zero, ocorre redução só de NADH e toda xilose pode ser convertida em etanol porque a conversão de xilose em xilulose é redox neutra; 2) Com uma relação NADPH/NADH infinita, não há atividade de

10 XR ligada à NADH e o excesso NADH só pode ser reoxidado através da produção de glicerol. Uma vez que a metabolização de xilose visa à produção de energia pela célula, a formação de glicerol não pode resolver o problema redox do sistema XR-XDH. *S. cerevisiae* é capaz de metabolizar xilulose, embora a taxas muito baixas (Matsushika *et al.*, 2009). O primeiro desafio na

15 realização de fermentação alcoólica eficiente de xilose por esta levedura foi a introdução de uma enzima heteróloga capaz de converter xilose em xilulose, sem causar desequilíbrios de cofator. A expressão de uma xilose isomerase iria oferecer esta possibilidade. Outra opção seria a escolha de uma levedura que possuía uma xilose redutase e uma xilitoldesidrogenase, que estejam ligadas à

20 mesma coenzima, eliminando assim a produção de NADH em excesso no processo de produção de etanol. Ambas as opções têm sido testadas. Petschacher *et al.* (2005) foram capazes de mudar a preferência do cofator da xilose redutase de *Candida tenuis* de NADPH para NADH por mutagênese sítio-dirigida. Infelizmente, este artigo não menciona as propriedades de

25 fermentação da xilose pelas cepas expressando a enzima modificada. A introdução de um xilose isomerase em *S. cerevisiae* foi tentada muitas vezes com resultados decepcionantes (Blow *et al.*, 1990; Gardonyi *et al.*, 2003). A falta de êxito dessas expressões heterólogas tem sido atribuída ao enovelamento impróprio, modificações pós-traducionais, formação de ponte dissulfeto, e ao

30 pH interno da levedura. Uma notável exceção nesta linha de pesquisa foi a xilose isomerase de *Thermus thermophilus* (Bai *et al.*, 2008; Walfridsson *et al.*, 1996). Esta foi a primeira xilose isomerase que foi funcionalmente expressa em *S. cerevisiae*. Contudo, a atividade da enzima isomerase só ocorria em temperaturas que permitiam o crescimento das células, mas não era alta o

suficiente para permitir a fermentação eficiente de xilose. Quando todas as enzimas envolvidas na conversão de xilulose de intermediários da glicólise foram superexpressadas a atividade de xilose isomerase (0,017 mg U-1) foi muito baixa para metabolismo eficiente de xilose (Karhumaa *et al.*, 2005).

- 5 Devido aos resultados decepcionantes da investigação xilose isomerase, muita atenção foi dada à expressão do XR e XDH de *P. stipitis* em *S. cerevisiae*. Contrariamente à xilose isomerase da arqueobactéria, estes genes eucarióticos poderiam ser funcionalmente expressos em *S. cerevisiae* (Kotteret *et al.*, 1990; Kotter *et al.*, 1993). No entanto, a fermentação anaeróbica de xilose nas cepas
- 10 engenheiradas levou a produção de níveis altos de xilitol. Para cada NADPH usado pela XR, um NADH precisa ser reoxidado, e a única maneira para estas leveduras atuarem assim é a produção de xilitol. Como descrito acima, cultivo anaeróbico em xilose de cepas de *S. cerevisiae* expressando tanto XR e XDH
- conduz à substancial produção de xilitol, a menos que um aceptor de elétrons
- 15 esteja presente. Em escala industrial, isso exigiria aeração exata dos reatores, que é demasiado caro para um processo de produção viável. A recente descoberta da xilose isomerase fúngica (Harhangi *et al.*, 2003) foi um importante avanço no domínio da fermentação de xilose. A xilose isomerase de fungo anaeróbico restrito *Piromyces* sp. E2 foi a primeira enzima de seu tipo
- 20 que pode ser funcionalmente expressa em *S. cerevisiae* em níveis elevados (Kuyper *et al.*, 2003). A introdução de XylA (xilose isomerase) foi suficiente para permitir que a cepa laboratorial CEN.PK113-7D crescesse lentamente em xilose como a única fonte de carbono em condições aeróbicas. Posteriormente, a cepa RWB202 expressando a XylA foi submetida a engenharia de evolução,
- 25 resultando na cepa RWB 202-AFX capaz de crescimento anaeróbico em xilose e produzindo principalmente, a partir de biomassa, etanol, CO₂, e glicerol, e pouco xilitol (Kuyper *et al.*, 2004). RWB 202-AFX cresceu quase que de forma idêntica ao tipo selvagem cultivada em glicose, com exceção de uma ligeira redução da taxa de crescimento específico. A taxa de produção de etanol de
- 30 RWB 202-AFX ainda era baixa demais para ser considerada para fins de aplicações industriais. Para obter uma maior taxa específica de produção de etanol, além da expressão de XylA, superexpressou-se todos genes de enzimas envolvidas na conversão de xilose em intermediários da glicólise: xiluloquinase e as enzimas da via das pentoses (ribulose 5-fosfato isomerase,

ribulose 5 fosfato epimerase, transcetolase e transaldolase). Além disso, o gene *GRE3* que codifica a aldoserredutase com atividade de xilose redutase foi excluído para minimizar a produção de xilitol. Em nível industrial essa deleção não é viável devido a aldoserredutase participar do processo de desintoxicação dos hidrolisados (Kuyper *et al.*, 2005a; Kuyper *et al.*, 2005b). O maior subproduto foi glicerol (van Dijken *et al.*, 1986). Quando a cepa expressando xilose isomerase, superexpressando genes da via das pentoses e deletada em *GRE3*, foi cultivada em batelada anaerobicamente com 20 g/l de glicose e xilose cada um, um consumo exponencial de glicose foi observado seguido por um muito mais lento, quase linear, consumo de xilose. Mesmo com esta característica o consumo de xilose e os perfis de metabólitos desta cepa engenheirada foram comparáveis aqueles em xilose como única fonte de carbono e ao tipo selvagem em glicose. Para melhorar as características de consumo de xilose em culturas com vários tipos de substrato, esta cepa foi submetida à engenharia evolutiva (Kuyper *et al.*, 2005a; Kuyper *et al.*, 2005b). Numa primeira fase, a cinética de absorção de xilose foi melhorada pelo cultivo de 85 gerações em um cultivo contínuo contendo concentrações limites de xilose. Em uma segunda fase, a cultura cultivada a longo prazo foi usada para inocular um reator batelada em misturas de glicose e xilose. Depois de 35 ciclos, uma única colônia foi selecionada desta cultura. Quando esta nova cepa foi cultivada em cultura em batelada anaeróbica com 20 g/l de glicose e xilose cada, todos os açúcares foram fermentados no prazo de 24 h. Esta cepa adaptada tem a mais alta taxa específica de crescimento anaeróbico, consumo de xilose e taxa de produção de etanol até o presente. Nesta cepa, a duplicação da taxa de absorção máxima (V_{max}) de ambos os açúcares foi observada, e no caso de xilose houve diminuição de K_m em 25%, o que contribuiu para a melhoria de cinética de absorção. Estes resultados nos levam a concluir que a cinética de fermentação de xilose não é mais um gargalo na fermentação de xilose para a produção de bioetanol. O desafio em fermentação da xilose é agora transferir com êxito cepas e conceitos do laboratório para condições industriais. Em um dos trabalhos mais atuais foi identificada uma xilose isomerase bacteriana de *Clostridium phytofermentans* e esta apresenta apenas 52% de identidade com a enzima correspondente de *Piromyces* sp E2, que até agora era a única enzima com significativa atividade em *S. cerevisiae*

na sua temperatura de crescimento. Esta enzima de origem bacteriana apresentou-se menos sensível à inibição por xilitol do que a enzima de *Piromyces*, embora tenha sido produzida em pequenas quantidades. A enzima bacteriana também apresentou atividade semelhante à de *Piromyces* sp E2 (Bratet *et al.*, 2009).

A rota existente na levedura *Saccharomyces cerevisiae* presente na patente WO 03/078643 envolve a redução de xilose a xilitol – reação catalisada pela xilose redutase (XR), que tem como cofator o NADPH e após catalise gera NADP⁺ - e posteriormente uma desidrogenação catalisada pelo xilitol desidrogenase (XDH), enzima NAD⁺ dependente, gerando NADH e xilulose (Fig.1). Essa xilulose é fosforilada a xilulose-5-P que por meio da via não oxidativa das pentoses é incorporada à via glicolítica como dois de seus intermediários: frutose-6-P e gliceraldeído-3-P que podem então ser posteriormente convertidos a etanol.

Fica patente na rota supracitada que há um desbalanço redox que compromete a utilização de xilose por essa rota: a XR demanda NADPH e gera NADP⁺, enquanto a XDH demanda NAD⁺ e gera NADH. O NADPH é regenerado a partir do NADP⁺ na via oxidativa das pentoses, o que ocorre normalmente em condições anaeróbias tais como as vigentes em processos fermentativos. Porém, para reoxidar o NADH e gerar NAD⁺ é necessário que a cadeia respiratória esteja ativa. E para isso ocorrer, haveria necessidade que se mantivesse certo nível de oxigenação do meio em fermentação (no caso dornas, a nível industrial), o que iria requerer mecanismo de controle para tal propósito, vindo a ser mais um fator além dos convencionais a agregar custos à produção de etanol. Além desse ponto negativo, há um agravante ainda pior: com a cadeia respiratória ativa, perde-se parte do etanol produzido e do substrato que seria utilizado para a produção deste porque com a cadeia respiratória ativa se utiliza ambos para prover a regenerar NADH. Com isso há redução de produção, devido à diminuição na quantidade de etanol produzida, e de produtividade posto que o substrato consumido não tem mais seu uso majorado para a produção de etanol, mas sim como fornecedor de intermediários da cadeia respiratória.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A inovação ora proposta se refere à levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, contendo o gene *xylA* da bactéria *Burkholderia cenocepacia* inserido via vetor plasmidial (pYEP PGK), permitindo a essa levedura expressar a enzima xilose isomerase através da rota representada na Fig. 1. Sendo com isso possível catalisar a isomerização direta da xilose a xilulose, suplantando assim o problema do desbalanço redox, a ser utilizada na produção de etanol.

A Figura 1 mostra as vias de catabolismo de xilose. Xilose redutase = (XR/GRE3); xilitol desidrogenase = (XDH), xiluloquinase = (XK) e a xilose isomerase(XI); G-3-P = gliceraldeído-3-fosfato; DHAP = dihidroxiacetona-fosfato; PEP = fosfoenolpiruvato.

A título de comparação na Fig. 2, são apresentados os resultados de consumo de açúcar, produção e rendimento de etanol pela levedura não transformada (controle- BY4741 wt) e pela levedura transformada (BY4741 + gene *XYLA*), após 24 h de fermentação em mosto contendo proporção de glicose e xilose similar a encontrada nos hidrolisados lignocelulósicos.

O primeiro resultado que chama a atenção quando comparamos a levedura selvagem com a levedura transformada é a quantidade de etanol produzido: a primeira produziu 4,6g/L de etanol enquanto que a segunda gerou 7,8g/L deste álcool. Para verificar o porquê dessa melhor produção, analisa-se a quantidade de glicose consumida: a levedura selvagem consumiu 13g/L de glicose enquanto que a transformada consumiu 13,2 g/L desse substrato, ou seja, valores da mesma ordem. Já que não se atribui esse aumento na produção de etanol a um maior consumo de glicose por parte da levedura transformada, analisa-se então a quantidade de xilose consumida de onde se verifica que a levedura transformada consumiu quase quatro vezes mais xilose que a selvagem: 2,1g/L contra 0,55g/L de consumo dessa pentose pela levedura selvagem. A partir dessa análise podemos relacionar o aumento na produção de etanol a um aumento no consumo de xilose pela levedura transformada. E com isso, calculamos o rendimento de etanol pela levedura transformada como sendo a razão entre a quantidade de etanol gerada e a soma das quantidades de glicose e xilose consumidas; este cálculo é diferente

do executado para avaliar o rendimento obtido pela levedura selvagem dado que ,como já se verificou, esta não utiliza xilose para a produção de etanol.

A partir dos resultados obtidos conclui-se que a inserção do gene *XYLA* de *B. cenocepacia*, que permite a levedura *S. cerevisiae* expressar a enzima xilose isomerase, proporcionou um aumento no consumo de xilose (aproximadamente quatro vezes maior que o obtido pela cepa selvagem), o que pode estar relacionado a um aumento na produção de etanol de cerca de 70%, e um incremento no rendimento em termos de etanol cerca de 46% (quando computado também o consumo de xilose para a cepa transformada).

A título de comparação foi elaborada a Tabela 1 abaixo, com os resultados obtidos neste trabalho e os dois melhores resultados verificados na literatura, nos quais também foram feitas inserções de genes *XYLA*, além de algumas outras modificações genéticas realizadas pelo grupo que inseriu o gene *XYLA* de *Piromycessp.* E2.

Construções gênicas	% (glicose-G) + % (xilose-X)	Tempo de fermentação (horas)	Consumo de glicose	Consumo de xilose	Produção de etanol	Rendimento	Referência
<i>XYLA</i> de <i>Piromyces</i> sp. E2 Superexpressão de XK e enzimas da via das pentoses deleção do gene GRE3	G2 % + X2 %	40	20g/L (100%)	20g/L (100%)	16g/L	40 %	[13]
<i>XYLA</i> de <i>Clostridium phytofermentans</i>	X3 %	150	-	18g/L (72%)	8g/L	44%	[14]
<i>XYLA</i> de <i>Burkholderia cenocepacia</i>	G3 % + X1 %	24	13g/L (65%)	2,1g/L (20%)	7,8g/L	51 %	presente trabalho

Tabela 1 – O primeiro citado, temos os resultados obtidos em van Maris, A. J. A. *et al.*(2007) Development of Efficient Xylose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: Xylose Isomerase as a Key Component. AdvBiochemEngin/Biotechnol 108: 179–204; O Segundo temos os resultados obtidos em Brat, D. *et al.*(2009) Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, 2304–2311 da *xylA* de *Clostridium phytofermentans*; O terceiro temos os resultados obtidos com a utilização de *xylA* de *Burkholderia cenocepacia*, feitas em nosso estudo.

Como é possível verificar, a despeito das diferentes condições de cultivo e fermentação adotadas por cada grupo de pesquisa, os resultados

obtidos no presente estudo puderam revelar níveis de produção de etanol semelhantes aos obtidos em Brat, D. *et al.*, 2009 (Functional Expression of a Bacterial Xylosyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Applied and Environmental Microbiology), resultado este obtido em um menor tempo de fermentação. Além disso, como se pode verificar, o rendimento obtido foi o melhor que o relatado em ambos os trabalhos, inclusive melhor do que o último artigo publicado na área de Suk-Jin Ha *et al.*, 2010, só que neste caso haveria necessidade que se mantivesse certo nível de oxigenação do meio em fermentação, não sendo viável, o que corrobora o quão relevantes são os resultados obtidos, utilizando a enzima xilose isomerase de *Burkholderia cenocepacia*.

MATERIAL E MÉTODOS UTILIZADOS NA CLONAGEM DA XILOSE ISOMERASE DE *BURKHOLDERIA CENOCEPACIA* EM *S. CEREVISIAE*

As cepas de levedura e bactérias, bem como plasmídeos utilizados, são mostrados na tabela 2.

Cepas/ Plasmídeos	Genótipo/Descrição	Origem/Referência
<i>E. coli</i> DH5-α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
pBluescript II KS	Vetor de clonagem com pUCori, P _{lac} , Amp ^R	Stratagene
pYE _{PGK} -RAGα ^{wt}	Vetor com 2μ e OriE, PGK	Watanabe <i>et al.</i> , 2007
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf, Germany
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	Cepa selvagem, isolada de paciente com fibrose cística, genomovar III	ATCC BAA-245

A Figura 3 mostra o mapa de restrição do plasmídeo pBluescript II KS.

A Figura 4 mostra o mapa de restrição do plasmídeo episomal pYE_{PGK}-RAGα^{wt} cedido pelo Dr. Seiya Watanabe da Universidade

de Kyoto – Japão (Watanabe *et al.*, 2007). Este plasmídeo estava com uma sequência pertencente ao pesquisador. Portanto, foi necessário digeri-lo para retirada desta sequência e inserção de *xylA* (xilose isomerase) de *Burkholderia cenocepacia*.

5

MEIOS DE CULTURA

O meio LB para bactéria é composto de 1% tripton, 1% NaCl ; 0,5% Extrato de Lêvedo (2% agar para meio sólido) e 2% glicose;

O meio SD para *Saccharomyces cerevisiae* é composto de 0,67% de base nitrogenada sem aminoácido (Difco, Detroit, USA), 2% glicose, suplementado com solução de 0,01% dos aminoácidos histidina, leucina e metionina sem uracila que é o marcador nutricional do plasmídeo.

AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR

As reações foram realizadas com aproximadamente 500 ng de DNA genômico de *Burkholderia cenocepacia* J2315 como *template*, 20 pmol de cada oligonucleotídeo, XylA-Bk-F - 5'TATAAGCTTATGTCGTATTTTGAACATAT TCC 3' e XylA-Bk-R - 5' TATGGATCC TCAGCGCAACCCGTAGATC 3', 1U de Pfu DNA polimerase e 2,5µM de dNTPs em solução tamponada para Pfu com um volume final de 50µl. A solução foi incubada por 2 minutos a 96 °C, seguido por 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58 °C por 1 minuto e a 72 °C por 3 minutos. Seguiu-se uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% e purificados pelo Kit da Qiagen.

25

MANIPULAÇÃO DE BACTÉRIAS

Cepa de *Escherichia coli* DH5α foi mantida em meio LB e manipulada de acordo com as técnicas descritas por (Sambrook *et al.*, 1989).

TRANSFORMAÇÃO DE *E. COLI* POR CHOQUE TÉRMICO

O método utilizado foi como descrito por (Hanahan, 1983). Onde as bactérias foram incubadas a 37 °C por 2 horas até uma OD₆₀₀ 0,6 (cultura em fase logarítmica), centrifugadas e ressuspensas em 0,1M de CaCl₂/15% glicerol gelado. Para armazenamento, as alíquotas da suspensão foram

mantidas congeladas à -80 °C até o momento do uso. Células competentes de *E. coli* foram descongeladas, e utilizadas alíquotas de 100 µl de célula e foi adicionado o DNA plasmidial, seguindo-se incubadas por 30 minutos no gelo, 90 segundos à 42 °C, foram adicionados 800 µl de LB e a mistura incubada durante 1 hora a 37 °C. Foi feito plaqueamento em meio LB sólido com antibiótico ampicilina 100mg/ml, para a seleção das bactérias transformantes.

EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *BURKHOLDERIA CENOCEPACIA*

Uma colônia foi inoculada em 2 ml de LB líquido. A seguir, incubou-se o cultivo a 37°C sob agitação por uma noite. Após crescimento, 1ml de cultura foi centrifugado em microcentrifuga por 2 minutos. As bactérias foram ressuspensas em 567 µl tampão TE (10mM Tris-HCl / 1mM EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético). Foi adicionado 30 µl de 10% de SDS (Dodecil sulfato de sódio) e 3 µl de 20mg/ml de proteinase K para uma concentração final de 100 µg/ml de proteinase K em 0,5% de SDS. Homogeneizou-se e incubou-se por 1h a 37°C. A seguir, adicionou-se 100 µl de 5M NaCl e homogeneizou-se. Adicionou-se, então, 80 µl de solução CTAB (NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; b-mercaptoetanol 0,2%) / NaCl (10% CTAB e 0,7M NaCl). Homogeneizou-se novamente e incubou-se por 20 minutos a 65°C. Numa próxima etapa, adicionou-se 0,7 ml de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1. Homogeneizou-se mais uma vez e centrifugou-se de 4 a 5 minutos em microcentrifuga. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de microcentrifuga e adicionou-se a solução de fenol:clorofórmio:álcoolisoamílico 25:24:1. Centrifugou-se por 5 minutos, transferiu-se novamente o sobrenadante para outro tubo e adicionou-se 0,6 ml de isopropanol para a precipitação do DNA. Centrifugou-se e descartou-se o sobrenadante. Lavou-se o precipitado com 70% de etanol para remover o CTAB residual e centrifugou-se novamente. Descartou-se o sobrenadante, secou-se e ressuspendeu-se o centrifugado em 100 µl de TE (Sambrook *et al.*, 1989).

30

MANIPULAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DE BACTÉRIA (MINIPREP)

Culturas de *E. coli* foram crescidas em meio LB com ampicilina 100mg/ml, centrifugadas, ressuspensas em 250 µl de tampão P1(10mM Tris-HCl / 1mM EDTA) e transferidas para um tubo de microcentrifuga. Foram

adicionados 250 µl de tampão P2 (0,2mM NaOH / 1% SDS) e homogeneizou-se. Foram adicionados 350 µL de tampão N3 (Acetato de sódio 3M pH 4,9) e o sistema foi homogeneizado novamente. Centrifugou-se por 10 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi adicionado na coluna QIAprep por pipetagem e
5 centrifugado durante 60 s. A coluna QIAprep foi lavada adicionando 0,5 ml de tampão PB (cloridrato de guanidina e isopropanol) e centrifugada por 60s. Novamente a coluna QIAprep foi lavada, adicionando-se 0,75 ml de tampão PE. Centrifugou-se por 60s. A seguir, a coluna QIAprep foi colocada em um tubo de microcentrífuga limpo de 1,5 ml para eluir o DNA. Adicionou-se, então,
10 50 µL de tampão EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) e centrifugou-se por 1 min (QIAprep Spin – Qiagen).

REAÇÕES ENZIMÁTICAS

Os DNAs plasmidiais extraídos de bactéria foram clivados com as
15 enzimas de restrição apropriadas e ligadas por T4 DNA ligase seguindo recomendações dos fabricantes, sendo tampão suplementado com PEG 4000.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os DNAs plasmidiais foram submetidos à eletroforese em gel de
20 agarose 1%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo, a uma voltagem de 100 V. A eletroforese de DNA foi realizada em 1X TAE (40mM Tris-acetato pH8,5; 2mM EDTA).

EXTRAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA DE GEL DE AGAROSE

25 Após a eletroforese, os fragmentos de DNA foram cortados do gel e purificados usando sistema QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Os fragmentos de DNA foram passados por uma coluna, sendo ligados a uma membrana de sílica-gel. A coluna foi lavada com álcool e o DNA puro foi eluído com tampão EB fornecido pelo kit.

30

TRANSFORMAÇÃO RÁPIDA DE *S. CEREVISIAE*

Como descrito em Chen *et al.*, 1992, 200 µl de suspensão de células, crescidas a 30°C com constante agitação por 18 horas até atingir fase estacionária ($OD_{570} \geq 1,0$), foram lavadas com TE e em seguida ressuspensas

em solução de LiAc-PEG-DTT (0,2M de acetato de lítio, 40% PEG₄₀₀₀, 100mM DTT). A esta suspensão de células adicionou-se 50ng-1000ng de plasmídeo num volume final de 100 µl. Incubou-se a 45°C por 1 hora e plaqueou-se em meio SD com os requerimentos nutricionais necessários.

5

METODOLOGIA USADA PARA COMPARAR CONSUMO DOS SUBSTRATOS (XILOSE/GLICOSE) E PRODUÇÃO DE ETANOL APÓS 24H DE FERMENTAÇÃO DE UMA CEPAS SELVAGEM DE *S.CEREVISIAE* E OUTRA TRANSFORMADA COM GENE *XYLA*

- *Meios de cultura e condições de crescimento celular*

10 Utilizou-se para pré-inóculo meios mínimos (SD2%) com a seguinte composição:

- **PARA A CEPA SELVAGEM BY4741:** em 100mL de meio, 0,67% (p/v) de base nitrogenada de levedo sem aminoácidos (YNB) + 2% de glicose + 0,008% dos requerimentos em termos de aminoácidos essenciais: leucina, histidina, metionina e uracila. Em todos os ensaios as células de *S.cerevisiae* BY4741 foram crescidas em erlenmeyers de 500mL adicionadas dos 100mL do meio acima descrito (proporção meio/volume erlenmeyer = 1/5) e foram crescidas, até concentração de 1mg de células/mL, a 28°C e sob agitação de 160rpm.

20 - **PARA A CEPA TRANSFORMADA EXPRESSANDO GENE *XYLA*:** em 100mL de meio, 0,67% (p/v) de base nitrogenada de levedo sem aminoácidos (YNB) + 2% de glicose + 0,008% dos requerimentos em termos de aminoácidos essenciais: leucina, histidina e metionina. No caso da levedura transformada não se adiciona uracila, pois este aminoácido funciona como um marcador nutricional (o vetor YEP PGK contém gene que codifica este aminoácido, que quando expresso permite a levedura que o contenha produzir uracila) e somente leveduras que contenham esse vetor e o tenham sendo expresso são passíveis de crescer em meio que não o contenha. Em todos os ensaios as células de *S.cerevisiae* BY4741 foram crescidas em erlenmeyers de 500mL adicionadas dos 100mL do meio acima descrito (proporção meio/volume erlenmeyer = 1/5) e foram crescidas, até concentração de 1mg de células/mL, a 28°C e sob agitação de 160rpm.

- *Condições de fermentação*

Para os ensaios de fermentação foram utilizados erlenmeyers de 125 mL contendo 50mL de meio com as seguintes composições: 0.4%

(NH₄)₂SO₄, 0.4% KH₂PO₄, além de glicose 3% + xilose 1% (G3 + X1) – razão de açúcares similar à obtida em hidrolisados. O pH era então ajustado para 5,0. Para o inóculo dos respectivos meios, verificou-se a concentração celular nos pré-inóculos por análise turbidimétrica (570nm) e coletou-se o volume de meio que, após prévia centrifugação e lavagem de centrifugado de células, proporcionasse uma concentração celular de 1,0mg de células/mL após ressuspensão nos respectivos meios de fermentação. A fermentação então podia ser iniciada e mantida, por um período de 24h, a 30°C e 90rpm. Após 24h retirava-se o meio, centrifugando-se e coletando-se o sobrenadante para análise de concentração de glicose (determinada pelo método da glicose oxidase-peroxidase – GOP), xilose (determinado pelo método do floroglucinol) e etanol (determinado por método fotolorimétrico após oxidação por dicromato). Os ensaios de fermentação e dosagem foram realizados também em triplicatas.

REIVINDICAÇÕES

- 1- *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, caracterizada pelo fato de utilizar cepas de levedura e bactérias, bem como plasmídeos na clonagem da xilose isomerase de *Burkholderia cenocepacia* em
- 5 *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2- *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por partir da xilose utilizando cadeia de *Saccharomyces cerevisiae* compreendendo genes para sobre expressão da xilose redutase, xilitol dehidrogenase e xiluloquinase.
- 10 3 *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o gene *xylA* de *Burkholderia cenocepacia* é inserido via vetor plasmidial (pYEP-PGK) à levedura *Saccharomyces cerevisiae* tornando-a capaz de expressar a enzima xilose isomerase (XI).
- 15 4- Uso da *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, conforme definido nas reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser na fermentação de glicose de hidrolisados de biomassa.
- 5- Uso da *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, conforme definido nas reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato
- 20 de ser na fermentação de xilose de hidrolisados de biomassa.
- 6- Uso da *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, de acordo com as reivindicações 4 e 5, caracterizado pelo fato de ser na produção de etanol.

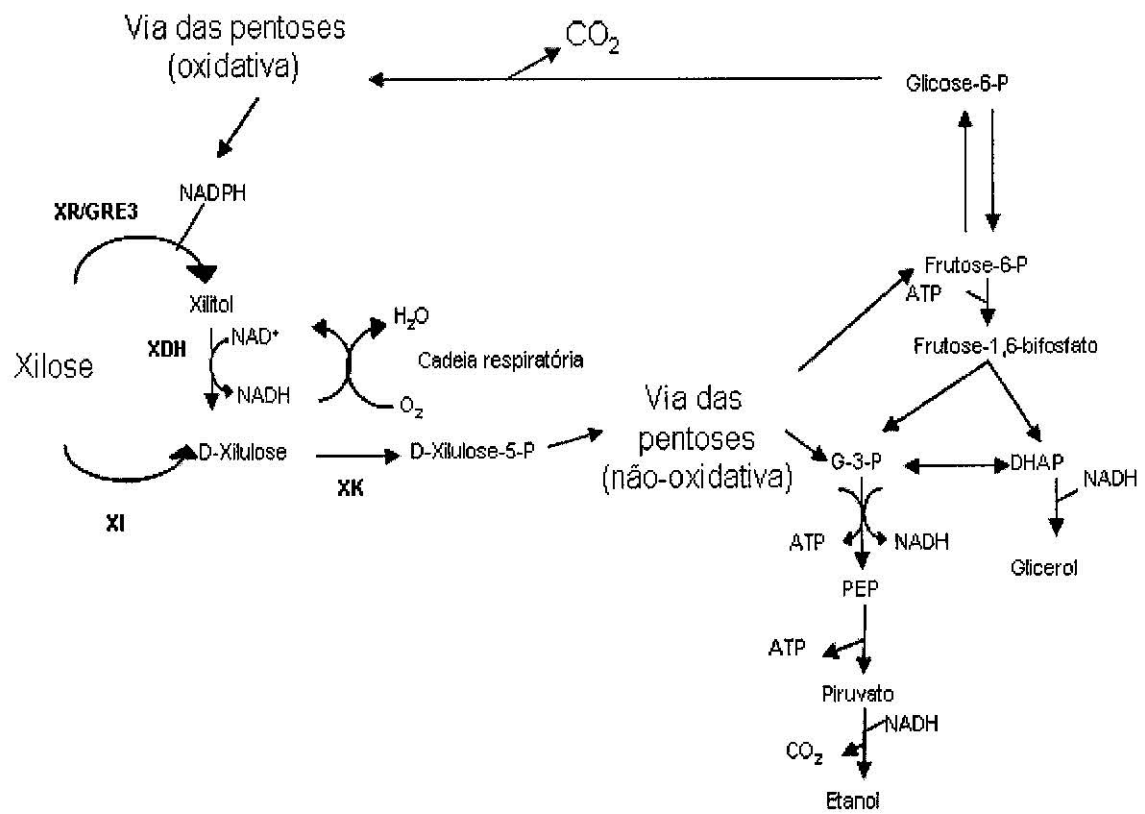
Figuras

Figura 1

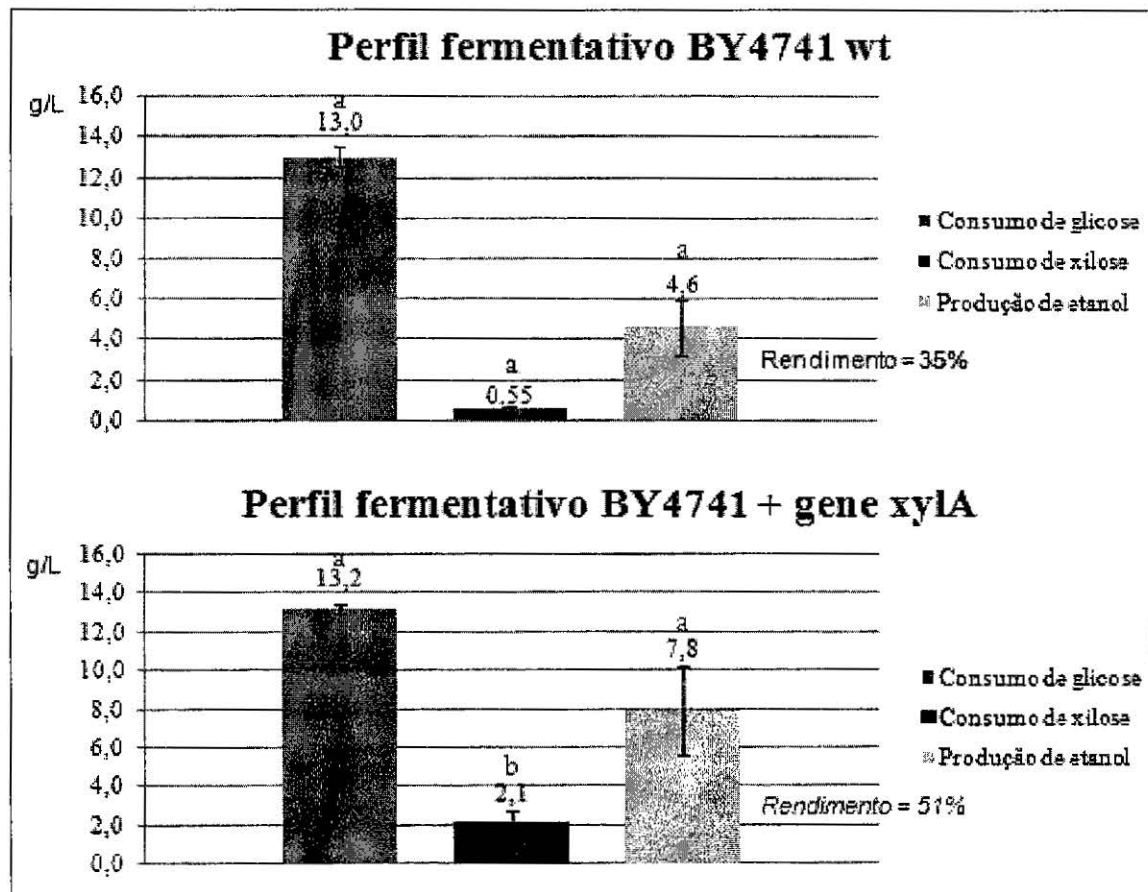


Figura 2

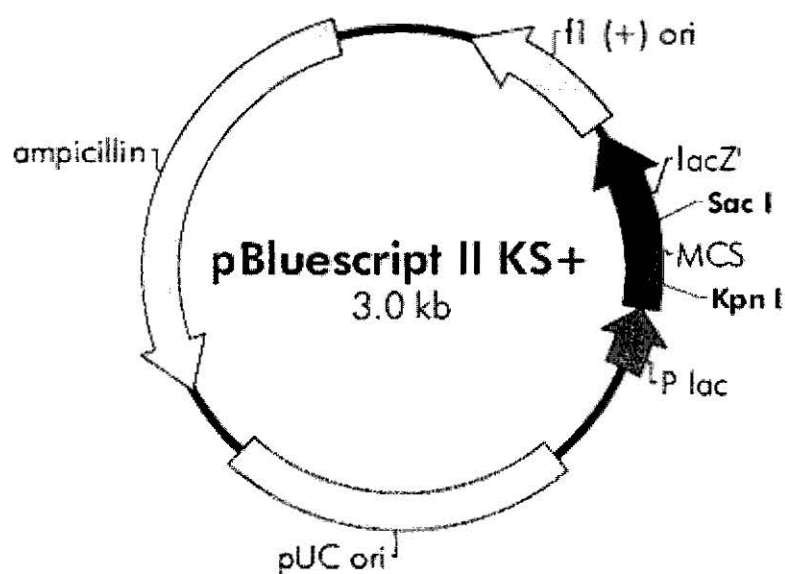


Figura 3

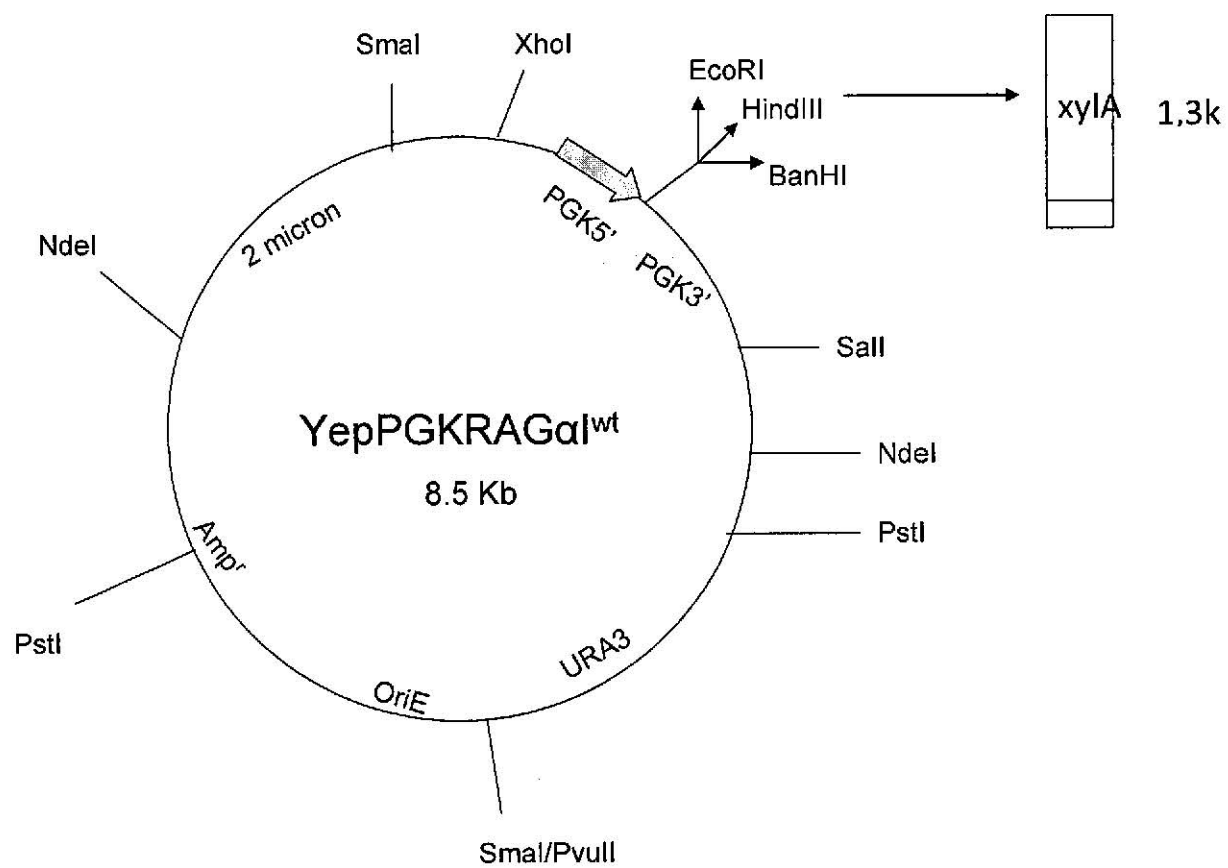


Figura 4

RESUMO**SACCHAROMYCES CEREVISIAE GENETICAMENTE MODIFICADA E SEU USO**

5

A inovação ora proposta diz respeito à levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada por meio da inserção via plasmidial (pYEP-PGK) do gene *xylA* da bactéria *Burkholderia cenocepacia*, que proporciona à levedura modificada a expressão da enzima xilose isomerase. A presente invenção inclui ainda o uso das ditas leveduras geneticamente modificadas na fermentação de glicose e xilose de hidrolisados de biomassa, como o bagaço da cana-de-açúcar, para a produção de etanol.

10